

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **63109780 A**

(43) Date of publication of application: **14.05.88**

(51) Int. Cl.

C12N 11/12
C12N 7/02

(21) Application number: **61253795**

(22) Date of filing: **27.10.86**

(71) Applicant: **ASAHI CHEM IND CO LTD**

(72) Inventor: **MATSUDA YUKIKO**
IJIMA HIDEKI

(54) **IMMOBILIZATION OF VIRUS**

direction of the wall thickness of the hollow fiber.

(57) Abstract:

COPYRIGHT: (C)1988,JPO&Japio

PURPOSE: To concentrate virus while keeping its infecting property and to immobilize the virus in a membrane pore with simple and highly safe handling operation, by perpendicularly filtering a liquid containing viruses with a specific porous membrane and freeze-drying the membrane.

CONSTITUTION: A liquid containing viruses is filtered essentially in perpendicular direction with a porous membrane made of a cuproammonium regenerated cellulose, preferably a porous hollow fiber wherein the virus diameter V (nm), average pore size D (nm) determined by water flow rate and a membrane thickness (μm) satisfy the relationship of formula. The viruses are captured in the membrane pore by sieving mechanism and the membrane is freeze-dried to immobilize the viruses in the pore. The porous membrane is preferably the one having at least one set of a structure having a minimum diameter part, a part having larger diameter than the minimum diameter and another minimum diameter part in the order between the inlet and the outlet of the pore passing through the membrane in the

$$9.5 > 0.5 \times 10^{(3.01 \times 10^{-3} V - 2.44 \times 10^{-5})} \times T \geq 1$$

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-109780

(43)Date of publication of application : 14.05.1988

(51)Int.Cl.

C12N 11/12

C12N 7/02

(21)Application number : 61-253795

(71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 27.10.1986

(72)Inventor : MATSUDA YUKIKO
IJIJIMA HIDEKI

(54) IMMOBILIZATION OF VIRUS

(57)Abstract:

PURPOSE: To concentrate virus while keeping its infecting property and to immobilize the virus in a membrane pore with simple and highly safe handling operation, by perpendicularly filtering a liquid containing viruses with a specific porous membrane and freeze-drying the membrane.

CONSTITUTION: A liquid containing viruses is filtered essentially in perpendicular direction with a porous membrane made of a cuproammonium regenerated cellulose, preferably a porous hollow fiber wherein the virus diameter V (nm), average pore size D (nm) determined by water flow rate and a membrane thickness (μ m) satisfy the relationship of formula. The viruses are captured in the membrane pore by sieving mechanism and the membrane is freeze-dried to immobilize the viruses in the pore. The porous membrane is preferably the one having at least one set of a structure having a minimum diameter part, a part having larger diameter than the minimum diameter and another minimum diameter part in the order between the inlet and the outlet of the pore passing through the membrane in the direction of the wall thickness of the hollow fiber.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-109780

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)5月14日

C 12 N 11/12
7/02

7329-4B
8717-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑮ 発明の名称 ウイルスの固定化方法

⑯ 特 願 昭61-253795

⑰ 出 願 昭61(1986)10月27日

⑱ 発 明 者 松 田 由 紀 子 大阪府高槻市八丁畷町11番7号 旭化成工業株式会社内
⑲ 発 明 者 飯 島 秀 樹 大阪府高槻市八丁畷町11番7号 旭化成工業株式会社内
⑳ 出 願 人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
㉑ 代 理 人 弁理士 佐々木 俊哲

明 細 書

1. 発明の名称

ウイルスの固定化方法

2. 特許請求の範囲

(1) ウイルスの存在する液体を、銅アンモニア法再生セルローズからなる多孔性膜で実質的に垂直透過して、該ウイルスを該膜孔中に捕捉し、しかる後に凍結乾燥して孔中に該ウイルスを固定化することを特徴とするウイルスの固定化方法。

(2) ウイルス径 V (nm) のウイルスの存在する液体を透過する多孔性膜が、水流速平均孔径 D (nm)、膜厚 T (μm) で(1)式を満足する多孔性中空繊維である特許請求の範囲第1項記載のウイルスの固定化方法。

$$9.5 > 0.5 \times 10^{\frac{(3.0 \times 10^{-3} V - 2.34 \times 10^{-2})}{T}} \geq 1 \quad (1)$$

(3) 多孔性膜が、膜厚内貫通孔の入口および出口における面内平均孔径の間に、極小の部分、該極小の部分より大きい部分、もうひとつの極小の部分の順に配列された構造を膜厚方向に少なくと

も1組有する銅アンモニア法再生セルローズからなる多孔性中空繊維である特許請求の範囲第1項又は第2項記載のウイルスの固定化方法。

(4) 多孔性膜が極小面内空孔率 P_r (%) が $10 \leq P_r \leq 80$ 、膜厚 T (μm) が $10 \leq T < 100$ を満足する銅アンモニア法再生セルローズからなる多孔性中空繊維である特許請求の範囲第1～第3項のいずれか1つに記載のウイルスの固定化方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、ウイルスが存在する液体を多孔性膜で、実質的に垂直透過し、ついで凍結乾燥して膜孔中にウイルスを蛋白質などのコーティング剤なしで固定化するウイルスの固定化方法に関する。本発明における固定化とは、膜上に蛋白質などをコーティングすることにより達成されるようなものではなく物質を多孔質膜の孔中に閉じ込め、1ヶ所に保留して動かぬようにすることを意味す

る。本発明方法は、ウイルスの検査、例えば肝炎ウイルスやエイズウイルスなどの免疫検査や、複数のウイルスが混在したウイルス液から目的とするウイルスあるいはウイルス群を固定化すること利用できる。

(従来技術)

ウイルスは細胞内でのみ増殖し、潜在的に病原性をもつ感染性の実体で、次のような属性をもつものである。①核酸としてDNAかRNAのどちらか一方を持つ。②遺伝物質のみ複製される。③二分分裂では増殖しない。④エネルギー産生系を欠く。⑤宿主のリボゾームを蛋白質合成に利用する。

現在ウイルスの濃縮方法には、粒子の大きさによる分画遠心法、溶解度差を利用した等電点処理法、有機溶媒による処理法、吸着溶出を利用した方法、粒子の形、密度を利用した密度勾配遠心法、酵素処理による方法等があり、それぞれのウイルスに適した方法を選択している。これらのう

00倍の濃縮液が得られている。しかし、一般にウイルス粒子を吸着させ、適当な溶出液で溶出する場合は、ウイルスの感染性の低下を起こしやすい。そのうえウイルス毎に条件を決める必要があり、非常に操作が煩雑である。また吸着量に限界があり、濃縮率は低い。

次に、遠別による方法であるが、これは限外濾過による濃縮である。『Canad. J. Chem., vol. 33, 1452 (1955), Gordon, J. L. & Mason, S. G.』に記載されているように、培養液などの試料を循環ポンプでフィルターに平行に流し、吸引でウイルス以外の成分をフィルターで濾過しウイルスを濃縮させるものである。これはフィルターに蛋白質が吸着するため目づまりがやすく、ウイルスの濃縮速度は遅い。また、種々の形や大きさを持つウイルスに適した孔径の膜を選択することはできない。

次にアルギネート膜による方法であるが、
『Transmission of Viru

ち膜を用いたウイルスの濃縮方法には、吸着溶出を利用した方法と遠別による方法とアルギネート膜による保留溶解による方法がある。

吸着溶出を利用した方法とは、適当な条件を与えウイルス粒子の表面荷電により吸着剤をコーティングした膜にウイルス粒子を吸着させ、次に塩濃度などの条件を変えることによってウイルス粒子をコーティングした膜より溶出させることができることを利用した濃縮方法である。例えば『Appl. Microbiol., vol. 23 (4) 76 (1972), Wallis, C. et al.』に記載されているように下水などの水に浮遊している腸内ウイルスではあらかじめ試料に除菌、除蛋白を行い、MgCl₂あるいはAlCl₃を加え、ウイルスをフィルターに吸着濾過させた後、溶出させている。また、ウイルス培養液では液中の吸着阻止物質をプロタミンなどで除去しpHを5.0に修正し濾過すると、ウイルスがフィルターに吸着し、次いでウシ胎児血清を濾過すると、ウイルスが溶出し、60~1

ses by the Water Route" (Ed. G. Berg), p. 121 Interscience, (1967), Gartner, H.』に記載されているように、この膜はアルギン酸ナトリウムの溶液にLa(NO₃)₃・6H₂O, AlCl₃・6H₂Oを加えてゲル化したもので、三層(capillary zone, intermediate layer, primary gel membrane)からなるものである。ウイルスを、このフィルターに保留させ融解して回収し、動物または培養細胞によるウイルス分離を行うものである。このフィルターにおいてウイルスは中間層に保留される。しかし、ゲル状であるため、もうく、非常に取り扱いにくく、保留できるウイルス量は限定されてくる。しかも、濾過後保留されたウイルスを乾燥状態で保存しておくことは不可能である。またフィルターを融解してウイルスを回収しなければならず、ウイルスの感染性の低下も起こしやすい。このように、アルギネート膜による方法は実用的で

はないといえる。

(発明が解決しようとする問題点)

ウイルスの濃縮を行う場合、従来の方法ではウイルスの感染性を維持することと濃縮効率を高めることの2つを同時に満足することは難しかった。かつウイルスは多くの場合液体中で浮遊状態にあり、常に空気中への飛散の可能性があるが、有害ウイルスを取り扱う場合において人体に対する安全性は考慮されていなかった。

本発明の目的は、ウイルスの種類にかかわらず、ウイルスの感染性を維持しながら濃縮でき、しかも、取り扱い操作がより簡単で安全性の高いウイルスの固定化方法を提供することである。

(問題点を解決するための手段)

本発明方法は、ウイルスの存在する液体を、銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性膜で実質的に垂直透過し、しかる後、凍結乾燥して、膜孔中にウイルスを固定化することを特徴とす

いほど望ましい。40℃、48時間、0.1N NaOH水溶液中に浸漬した際、この溶解分が10ppm以下であれば、この中空繊維はウイルスを濃縮するのに最も適している。

上述のようなセルロースからなる膜を作製するには、高純度セルロース原液を用いて銅アンモニア法再生セルロースを作製するか、あるいは膜を作製後に0.1N NaOH水溶液で72時間以上洗浄処理すれば良い。高純度セルロース原料を用いれば、上記溶解分が著しく減少するので、より好ましい。ここで、『高純度セルロース原料』とは、α-セルロース含有量が95wt%以上で、重合度が500以上の木綿リントーおよび木材パルプを指す。これらの原料について、ブリーチング、洗浄工程中での分解および酸化を防止しつつ、不純物の混入を避けるため、常に精製された水を用いると良い。

銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性膜でのウイルス固定化に際して、ウイルス径V(nm)、膜の水流速平均孔径D(nm)、膜厚

る。

再生セルロースの製法には、ビスコース法、セルロースエステルのケン化法、銅アンモニア法など、種々のものがあるが、それぞれ、製造条件の相違により物理的、化学的な性質に差があり、『再生セルロース』として一律に論じられるものではない。銅アンモニア法では、不可欠な酸処理により銅の除去に伴う微細な孔の発生と特異な分子鎖の凝集構造の発生が認められるため、銅アンモニア法再生セルロースは特異な性質を持つ。

その性質の特徴は、親水性で、かつ蛋白質の吸着性が少ない点にある。本発明者らは、蛋白質と高分子素材との吸着性に関する相関性を検討した結果、一般的には、親水性素材ほど、蛋白質の吸着性が小さく、本発明方法に用いられる銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維が1番小さいことを見いだした。

銅アンモニア法再生セルロースの粘度平均分子量は 7×10^4 以上が好ましく、また0.1N NaOH水溶液中での溶解成分が少なければ少な

T(μm)とすると、

$$9.5 > 0.5 \times 10^{(9.01 \times 10^{-3} \sqrt{1 - 2.34 \times 10^{-2} D})} \times T \geq 1 \quad (1)$$

の条件を満たすことが好ましい。

ここで、ウイルス径Vとは、球状ウイルスではその直径を、また、非球状ウイルスでは、楕円体に近似したときの短軸の直径を差す。(1)式の値が9.5以上であると、膜のウイルス阻止率が高く、膜孔中にウイルスが侵入することができない。

また、(1)式の値が1より小さいとウイルスの損失が多く、多孔性膜を構成する物質(ウイルスの媒体とよぶ、原液では水が、膜中に捕捉されたウイルスでは膜を構成する再生セルロースが媒体である)1g当たりのウイルス密度をウイルス原液1g(=1ml)あたりのウイルス密度より大きくすることが出来ない。

膜によるウイルス粒子の分離機構としては、膜の孔径の大きさと分離すべきウイルス粒子の粒子径との違いによりふるい分ける『ふるい機構』と、膜表面にウイルス粒子を吸着させる『吸着機

構」がある。銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性膜では、蛋白質の吸着性が他の高分子素材にくらべて、最も小さいという本発明者らの検討結果を考慮すれば、銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性膜によるウイルス分離は、殆ど「ふるい機構」であると考えられる。

多孔性膜としては、平膜でも中空繊維でも使用できるが、好ましくは中空繊維である。

銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維において、内壁面から外壁面への膜厚方向に垂直な面における孔径を面内平均孔径で表す時、膜内貫通孔の入口及び出口における面内平均孔径の間に、極小の部分、該極小の部分より大きい部分、もうひとつの極小の部分の順に配列された構造が、中空繊維の膜厚方向に少なくとも1組存在するものを用いるとよい。ここで言う極小とは、数学的意味での極小をさす。すなわち、本発明においては、膜表面の面内平均孔径がそのすぐ内側面の面内平均孔径より小さいような膜は、「膜表面は極小の部分」とはいわない。

部が生じたり、中空繊維を構成するセルロース分子が、濾液中あるいは被濾過液中に脱落分散する恐れがある。

中空繊維の膜厚は薄ければ薄いほど、一般的には透過速度が大きくなるので好ましい。しかしながら、膜厚が10 μ m未満になると、中空繊維にはピンホールが多発し、ウイルス粒子が濾液中に漏れ出てくる。また膜厚が100 μ m以上になると、透過速度が大きく低下してしまう。極小面内空孔率が大きくなれば膜厚をより厚く設計する方が被捕捉ウイルス数が増加して良い。

本発明方法に用いられる銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維は、該中空繊維の内壁面から外壁面への膜厚方向に層状構造を有し、蛋白質の透過性、ウイルスの阻止性、ウイルスの捕捉性をより支配する極小部を有している。その極小部分の膜厚方向での厚みは、該多孔性中空繊維が、マイクロ相分離法で作製されるため、セルロース濃厚相粒子の直径に相当する。したがって、その厚みは2 μ m以下である。

この構造により、従来の多孔質中空繊維にくらべて、銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維のウイルスの阻止率を高くすることができ、孔中にウイルスを捕捉できると共に、透過速度を速めることができる。これに対して、面内平均孔径の極小部が少なくとも1組以上存在しない多孔性中空繊維の場合では、阻止率を90%以上にするには、透過速度を遅くせざるを得ず、またウイルスを中空繊維孔中に捕捉し、濃縮することはできない。

銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維において、極小面内空孔率は10%以上であることが好ましい。10%未満では、限外透過速度は急激に低下する。好ましくは30%以上である。限外透過速度に及ぼす面内空孔率の影響は、10%未満では極小面内空孔率の5乗、10~30%では約2乗、30%を超えると約1乗に比例して限外透過速度は増加する。一方、極小面内空孔率が80%を超えると、多孔性中空繊維の力学的性質は著しく低下し、ピンホール等の欠陥

本発明方法で用いられる銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維の製造方法としては、例えば、セルロースリントー(α -セルロース含有量96%以上、平均分子量 2.6×10^5)を公知の方法で調整した銅アンモニア溶液中に8wt%の濃度で溶解したものを紡糸原液として用いる。この紡糸原液に対して、アセトン/アンモニア/水系混合溶液を凝固剤および中空剤として用いてマイクロ相分離を生起させ、その後、凝固、再生することにより得られる。ここで、マイクロ相分離とは、溶液中に高分子の濃厚層あるいは希薄層が直径0.02~数 μ mの粒子として分散し、安定化している状態を意味する。マイクロ相分離の生起は、紡糸中の糸の失透現象によって直接肉眼観察するか、あるいは紡糸後の糸の電子顕微鏡観察により、直径1 μ m以下、0.02 μ m以上の粒子の存在で確認される。

本発明方法による実施例を説明するに先立ち、本明細書中に用いられる主な技術用語(物性値)の定義とその測定方法を以下に示す。

〔水流速平均孔径〕

銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維のモジュールを作製し、そのモジュール状態で、中空繊維の水の流出量を測定し、(2)式から水流速平均孔径を求めた。

$$D(nm) = 2.0 \times \sqrt{\frac{V \cdot T \cdot \mu}{\Delta P \cdot A \cdot Pr \rho}} \quad (2)$$

V: 流出量 (ml/min)

T: 膜厚 (μm)

ΔP: 圧力差 (mmHg)

A: 膜面積 (m²)

Pr ρ: 空孔率 (-)

μ: 水の粘性率 (cP)

空孔率 Pr ρ は水膨潤時の見掛け密度 ρ_{aw}、ポリマーの密度 ρ_p より (3) 式で求めた。セルロースの場合 ρ_p = 1.561 を用いた。

$$Pr \rho (\%) = (1 - \rho_{aw} / \rho_p) \times 100 \quad (3)$$

〔平均分子量〕

銅アンモニア溶液中 (20℃) で測定された極限粘度数 [η] (ml/g) を (4) 式に代入す

ることにより平均分子量 (粘度平均分子量) M_v を算出する。

$$M_v = [\eta] \times 3.2 \times 10^3 \quad (4)$$

〔極小面内空孔率〕

銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維をアクリル樹脂で包埋後、ウルトラミクロトーム (LKB社 (スウェーデン) 製 Ultratome III 8800 型) に装着したガラスナイフをもちいて、外壁面から膜厚方向に沿って厚さ約 1 μm の試料を順に切り出す。その試料切片をクロロホルムで脱包埋後、それぞれの切片の電子顕微鏡写真をとる。注目する切片の 1 cm² 当たり、孔半径が (r) ~ (r + dr) に存在する孔の数を N(r) dr と表示する。3 次および 4 次の平均孔半径 (それぞれ \bar{r}_3 および \bar{r}_4) は次式で定義される。

$$\bar{r}_3 = \frac{\int_0^\infty r^3 N(r) dr}{\int_0^\infty N(r) dr} \quad (5)$$

$$\bar{r}_4 = \frac{\int_0^\infty r^4 N(r) dr}{\int_0^\infty N(r) dr} \quad (6)$$

平均孔径は $2 \sqrt{\bar{r}_3 \cdot \bar{r}_4}$ で (5) 式および (6) 式から計算される。それぞれの切片の電子顕微鏡写真より平均孔径を計算し、面内平均孔径の内壁面からの距離に対する図示より、極小面内孔径を示す面を決定する。その決定された面の空孔率を極小面内空孔率と定義する。その極小面内空孔率は (7) 式で求められる。

$$Pr (\%) = \pi \int_0^\infty r^2 N(r) dr \times 100 \quad (7)$$

〔ウイルス阻止係数〕

濾過しようとする水溶液単位体積当たりのウイルスの数 N₀、膜を透過した濾液単位体積当たりのウイルスの数 N のとき下記 (8) 式で定義される。

$$\phi = -\log (N / N_0) \quad (8)$$

〔発明の効果〕

本発明によれば、ウイルスが存在する液体から、ウイルスの感染性を低下させることなく、かつ人体により安全に、ウイルスを固定化して濃縮

することが出来る。そして、血清肝炎ウイルスやエイズウイルスのような感染するウイルスの免疫検査を中空繊維の孔中にウイルスを固定した状態で行える。また、複数のウイルスが混在したウイルス液から目的とするウイルスあるいはウイルス群を分別あるいは固定化濃縮することに利用できる。

〔実施例〕

以下、本発明方法によるウイルスの固定化方法の実施例を示す。

〔実施例 1〕

セルロースリントー (α-セルロース含有量 96% 以上、平均分子量 2.8×10^5) を公知の方法で調整した銅アンモニア溶液中に 8 wt% の濃度で溶解し、濾過脱泡を行い、紡糸原液とした。その紡糸原液を環状紡糸口の外側紡出口 (外径 2 mm φ) より 2.5 ml/min で、一方中空剤として、アセトン 4.5 wt% / アンモニア 0.575 wt% / 水 54.425 wt% の混合

溶液（中空剤）を中央紡出口（外径0.8mmφ）より1.7ml/minでそれぞれアセトン45wt%/アンモニア0.575wt%/水54.425wt%の混合溶液（凝固剤）中に直接吐出し、12m/minの速度で巻き取った。なお、吐出直後の透明青色状の繊維状物は次第に白色化し、ミクロ相分離を生じ、ひきつづいて凝固が起こり、繊維としての形状が維持されていた。その後、2wt%の硫酸水溶液で再生し、その後、水洗した。水洗後の中空繊維をアセトンで、中空繊維内部の水分を置換し、その後、10%延伸した状態で真空乾燥した（25℃×1.5時間）。このようにして得られた銅アンモニア法再生セルロース多孔性中空繊維の内径は300.2μm、膜厚は28.5μm、水流速平均孔径は10.8nm、極小面内空孔率は28%であった。（1）式より計算された値は9.4であった。

大腸菌ファージφ×174（IFO20009、ウイルス径25nm）を大腸菌（IFO13

るために、凍結乾燥した中空繊維約100mg（中空繊維で40本）を0.5%セルラーゼ溶液（pH5.0、0.1N酢酸緩衝液にヤクルト製オノズカR-10を溶解）10ml中に37℃で浸漬してセルロースを分解し、pHを7.0に調整後、分解液を9000r.p.mで10分間遠心し、上澄液中のファージ濃度をブラック法で測定したところ、 3.8×10^7 （PFU/ml）であった。したがって中空繊維1g中に 3.8×10^9 PFUのファージが存在しており、媒体1g中のウイルス密度は原液より高くなっていた。

（比較例1）

セルロース濃度10%、アンモニア濃度7%、銅濃度3.6%の組成と2000ポイズの粘度を有する銅アンモニア再生セルロース原液を、2重環状紡口の外側紡出口（外径5mm）から20ml/minで押し出し、同時に中央の直径1mmの管からパークロルエチレンを5ml/minで押し出した。次に押し出された線状紡糸原液を直

898）に感染させファージ原液を調製した。ファージ濃度を寒天重層法によりブラック形成数から測定したところ、 1.9×10^9 （PFU/ml）であった。上記銅アンモニア法再生セルロース中空繊維100本よりなるガラス製ミニモジュールの入口より上記ファージ原液を中空繊維中空部に送入し、中空部出口を閉じた状態で、ファージ原液11mlを圧力200mmHgで通過し、濾液5mlを得た。濾液1ml中のファージ濃度をブラック法で定量したが、ファージは確認されなかった。従って、φは9.2以上であった。続いてモジュール出口を開き、生理食塩水をペリスタリックポンプで毎分10mlの流量でモジュールに送入しながら、膜にかかる圧力が約200mmHgになるよう調節して中空部および孔内を十分に洗浄した。洗浄終了直前の濾液および中空部を通過した洗浄液中にはブラック形成法によりファージは確認されなかった。モジュール洗浄後、中空繊維を凍結乾燥した。

中空繊維孔中に捕捉されたファージ量を測定す

接空气中に300mm自由落下させ、次いで11wt% NaOH水溶液に導入し、8mの凝固浴を巻き取り速度100m/minで通過させた。凝固浴から引き出した糸は水洗後、3%硫酸で再生し、再び水洗した。その後130℃で乾燥し、つづいて中空部内の有機溶媒を押し出した。このようにして得た中空繊維の内径は285μm、膜厚25μm、水流速平均孔径は8nm、面内空孔率は10%以下であった。（1）式から計算した値は9.7であった。

実施例1と同様のファージ原液を通過し、濾液5mlを得た。濾液中にはブラック法によりファージは確認されなかった。実施例と同様にセルラーゼ処理で中空繊維を分解し、遠心上澄みのファージ濃度をブラック法で定量したところ、ファージは確認されなかった。従って、ファージは中空繊維孔中にはほとんど捕捉されていなかった。

(実施例2)

以下の条件で実施例1と同様に多孔性中空繊維を作製した。セルロース濃度：7%、中空剤組成：アセトン/アンモニア/水=40/0.56/59.44、凝固剤組成：中空剤組成と同じ、中空剤吐出速度：2.2 ml/min、紡糸原液吐出速度：2.2 ml/min、紡糸速度10 m/min。得られた中空繊維の内径は238.4 μm、膜厚は29.0 μm、平均孔径48.6 μm、極小面内空孔率は30.2%であった。(1)式より計算した値は1.2であった。

実施例1と同様にφ×174のファージ原液(ファージ濃度 7.3×10^7 PFU/ml)を濾過した。濾液中のウイルス濃度は 7.1×10^6 PFU/mlであった。したがって、φは1.01であった。実施例1と同様に生理食塩水で十分に洗浄した後、凍結乾燥した。洗浄終了時の濾液中にはファージが確認されなかった。

実施例1と同様にセルラーゼ処理をし、中空繊維孔中に捕捉されたファージ量を測定したところ、

濾過した。濾液中のウイルス濃度は 7.9×10^9 PFU/mlであった。したがって、φは4.1であった。実施例1と同様に生理食塩水で十分に洗浄した後、凍結乾燥した。洗浄終了時の濾液および中空部を通過した洗浄液中にはファージが確認されなかった。

実施例1と同様にセルラーゼ処理をし、中空繊維構造体中に捕捉されたファージ量を測定したところ、遠心分離上澄液中のファージ濃度は 2.1×10^3 PFU/mlであった。従って、中空繊維1g中に 2.1×10^{10} PFUのファージが存在していた。従って、媒体1g中のファージ密度は、原液より高くなっており、ファージは中空繊維孔中に濃縮されて捕捉されていた。

(実施例4)

実施例2と同様の多孔性中空繊維を用いた。大腸菌ファージとしてT4ファージ(IFO20004)宿主菌として大腸菌(IFO13168)を用いた。T4のウイルス径は85 nmとした。

ろ、遠心分離上澄液中のファージ濃度は 7.9×10^5 PFU/mlであった。したがって中空繊維1g中に 7.9×10^7 PFUのファージが存在していた。従って、媒体1g中のファージ密度は原液より高くなっていた。

(実施例3)

以下の条件で実施例1と同様に多孔性中空繊維を作製した。セルロース濃度：8%、中空剤組成：アセトン/アンモニア/水=45/0.575/54.425、凝固剤組成：中空剤組成と同じ、中空剤吐出速度：1.7 ml/min、紡糸原液吐出速度：2.5 ml/min、紡糸速度10 m/min。得られた中空繊維の内径は310.84 μm、膜厚は22.9 μm、平均孔径20.9 μm、極小面内空孔率は27.5%であった。(1)式より計算した値は4.4であった。

実施例1と同様にφ×174のファージ原液(ファージ濃度 1.1×10^{10} PFU/ml)を

従って、(1)式より計算した値は1.3であった。ファージ原液のファージ濃度は 9.5×10^9 (PFU/ml)であった。この原液を実施例1と同様に濾過した。濾液中のウイルス濃度は 4.3×10^6 (PFU/ml)であった。従って、φは3.3であった。分離に引き続いて実施例1と同様に生理食塩水で十分に洗浄した後、凍結乾燥した。洗浄終了時の濾液および中空部を通過した洗浄液中にはファージが確認されなかった。

実施例1と同様にセルラーゼ処理をし、中空繊維孔中に捕捉されたファージ量を測定したところ、遠心分離上澄液中のファージ濃度は 3.7×10^7 PFU/mlであった。従って、中空繊維1g中に 3.7×10^9 PFUのファージが存在していた。

(比較例2)

以下の条件で実施例1と同様に多孔性中空繊維を作製した。セルロース濃度：7%、中空剤組成：アセトン/アンモニア/水=40/0.56/

59.44、凝固剤組成；中空剤組成と同じ、中空剤吐出速度；3.5 ml/min、紡糸原液吐出速度；2.2 ml/min、紡糸速度10 m/min、得られた中空繊維は膜厚は19.2 μm、平均孔径56.3 nmであった。(1)式より計算した値は0.5であった。

実施例1と同様にφ×174のファージ原液(ファージ濃度 6.3×10^9 (PFU/ml))を濾過した。濾液中のウイルス濃度は 1.8×10^9 (PFU/ml)であった。したがって、φは0.5であった。実施例1と同様に生理食塩水で十分に洗浄した後、凍結乾燥した。洗浄終了時の濾液および中空部を通過した洗浄液中にはファージが確認されなかった。

実施例1と同様にセルラーゼ処理をし、中空繊維孔中に捕捉されたファージ量を測定したところ、遠心分離上澄液中のファージ濃度は 3.3×10^7 PFU/mlであった。したがって中空繊維1g中に 3.3×10^9 PFUのファージが存在していた。媒体1g中のファージ密度は原液よ

であった。この膜をミリポア製ステンレスフィルターホルダーに装着し、実施例4と同じT4ファージの原液(2×10^7 PFU/ml)を圧力200 mmHgで垂直濾過し、濾液5 mlを得た。濾液中のウイルス濃度は 3.2×10^2 (PFU/ml)、φは4.8であった。次いで生理食塩水で十分に水洗した後、凍結乾燥した。洗浄時の濾液中にファージは確認されなかった。実施例1と同様にセルラーゼ処理して、膜中に捕捉されているファージ量を定量したところ、膜1g中に 3.9×10^7 PFUのファージが捕捉されていた。

代理人 弁理士 佐々木 俊哲

り低くなった。

(実施例5)

セルロースリンター(α-セルロース含有量96%以上、平均分子量 2.6×10^5)を公知の方法で調整した銅アンモニア溶液中に8 wt%の濃度で溶解した。この溶液を25℃のアセトン/アンモニア蒸気雰囲気下に置かれたガラス板上に均一に流延し、該雰囲気下に1分から10分間放置した後、20℃のアセトン25 wt%/2.8%アンモニア水2 wt%/水73 wt%の混合溶液にガラス板ごと10分から80分間浸漬し、その後20℃の2 wt%硫酸水溶液中に10分間浸漬後、水洗し、しかる後、水分をろ紙ですい取り、20℃のアセトン(100 wt%)中に15分間浸漬し、膜中の水分をアセトンで置換し、ろ紙にはさんで風乾し、平均孔径を異にする再生セルロース多孔平膜を得た。

得られた膜は、平均孔径83 nm、膜厚133 μmであった。(1)式より計算した値は4.0